

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РОСТА КОСТНОЙ И КОЖНОЙ ТКАНЕЙ В ПОРИСТОМ ИМПЛАНТАТЕ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОМ ДЛЯ КРЕПЛЕНИЯ НАРУЖНОГО ПРОТЕЗА ПОСЛЕ АМПУТАЦИИ КОНЕЧНОСТИ

© О. В. Галибин,^{1,*} М. В. Протасов,¹ Ю. В. Чиховская,¹ И. Г. Беляева,¹ М. Р. Питкин²

¹ С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, отдел экспериментальной медицины Научно-исследовательского центра, Санкт-Петербург, Россия,

² Tufts University, Boston, USA;

* электронный адрес: ogalibin@mail.ru

Выполнено моделирование *in vivo* (на крысах линии Wistar) методикой полной интеграции протеза ампутированной конечности с культей, согласно которой крепление протеза к культе осуществляется с помощью металлического стержня, один конец которого имплантирован в кость культи, а другой конец выводится через ткани и кожу культи наружу на 5—7 см над поверхностью культи. Эта процедура включает в себя не только успешную имплантацию в кость культи, но и возможность заполнения пор металлического стержня клетками кожи на участке выхода стержня наружу. Пористый титановый стержень имплантировали в кость лабораторных животных с удаленной конечностью. Продемонстрировано проникновение клеток кости и кожи в поры исследуемого материала, что обеспечивает его более плотную фиксацию в кости и показывает перспективу развития естественного кожного барьера инфекции.

Ключевые слова: пористый титан, остеоинтеграция, дермоинтеграция, клеточная адгезия.

Традиционная схема крепления протеза после ампутации конечности включает в себя изготовление индивидуальной гильзы, достаточно плотно облегающей культю конечности, на которой затем монтируются остальные узлы протеза. Незыблемость этой схемы, существующей не менее двух тысячелетий, была поколеблена в конце XX в. (Vranemark et al., 2001), когда было предложено крепить протез непосредственно к кости культи с помощью имплантированного стержня-переходника, входящего снаружи через кожу и мягкие ткани культи. В настоящее время все большее значение придается разработке новых моделей постоянно носимых переходников для крепления протезов нижней конечности. Проблема такого рода протезирования заключается прежде всего в том, что нахождение в течение длительного времени твердого стержня в кости приводит к ее разрушению и выпадению стержня. Другая проблема — частые инфекционные осложнения. Механическая нагрузка, травматизация культи могут приводить к незаживающим кожным дефектам культи, что становится причиной удаления протеза.

Если вопрос взаимодействия костной ткани и титанового протеза практически решен, остается много вопросов в области пограничных взаимоотношений кожи и металла (Sullivan et al., 2003). Попытки оптимизации поверхностных механических свойств протеза до сих пор не были успешными, в клинических испытаниях было показано, что в случае использования гладких протезов кожа культи свободно движется в отношении металлического стержня, что приводит к частым инфекционным

осложнениям (Deligianni et al., 2001; Sooriakumaran et al., 2004). Так, в Англии при подобных испытаниях (11 пациентов) поверхностные инфекционные поражения культи были отмечены у 6 человек, у 1 пациента была зарегистрирована глубокая гнойная инфекция (Sooriakumaran et al., 2004).

С целью уменьшения риска инфекции на границе кожи культи и протеза было предложено использование пористых титановых структур. Были проведены пилотные исследования экспериментального материала *in vitro* и *in vivo* (Blinova et al., 2004; Galibin et al., 2004; Pitkin et al., 2004). В эксперименте *in vitro* титановые пористые пластинки в течение 7 сут инкубировали с человеческими кожными фибробластами и стромальными клетками костного мозга кролика. Уже через 7 сут на поверхности пластин образовывался монослой клеток, при электронном микроскопическом исследовании клетки были обнаружены также и внутри пор материала. *In vivo* производили подкожную имплантацию исследуемых титановых пластин. Ни в одном случае не было отмечено формирования очагов инфекции и воспаления. На основании проведенных опытов был сделан вывод о возможности применения исследуемого материала для изготовления постоянно носимых протезов.

Задачей настоящего исследования явилось экспериментальное обоснование применения внутрикостных пористых титановых стержней, которые не только обладают свойством плотной фиксации металла в кости, но и не вызывают гнойно-септических осложнений.

Материал и методика

Титановый пористый материал. В эксперименте использовали титановые стержни цилиндрической формы длиной 40 и диаметром 2 мм (производство ADMA Products, Inc., Twinsburg, OH, США) по спецификациям, тестированным в предыдущих исследованиях (Pitkin et al., 2004; Pitkin, Raykhtsaum, 2005). Для формирования сферических частиц использовали титан для хирургических целей ASTM F-67. Средний размер частиц составлял 450 мкм, пористость материала — 30 %. В контрольной серии был использован гладкий титановый стержень аналогичного диаметра.

Лабораторные животные и техника операции. Лабораторных животных (взрослые крысы-самцы линии Wistar — $N=7$; масса тела — 225—250 г; питомник Рапполово, Россия) содержали в условиях 8-часового светового дня, со свободным доступом к воде и корму. Дизайн эксперимента одобрен этическим комитетом СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Операции проводили в стерильных условиях под общей анестезией.

В экспериментальную группу вошли 4 крысы массой тела 220—250 г, которым была выполнена ампутация задней конечности на уровне нижней трети бедра с имплантацией штифта из пористого титана.

В асептических условиях под эфирным наркозом произведен циркулярный разрез кожи в области верхней трети голени. Кожно-фасциальный лоскут отсепарирован на голени и в верхней и средней третях бедра. Сосудистый пучок прошит и перевязан в средней трети бедра. Мышцы бедра пересечены циркулярным разрезом на уровне нижней трети бедра. Пересечены капсула и связочный аппарат коленного сустава — выполнена экзартикуляция задней конечности в коленном суставе. Дистальный эпифиз бедренной кости сколот щипцами Листона. Костномозговой канал трепанирован и последовательно рассверлен фрезами диаметром 1,0, 1,5 и 2,0 мм. Ткани операционной раны и полость костномозгового канала промыты 3%-ным раствором перекиси водорода. Кровотечения нет. В рассверленный костномозговой канал имплантирован штифт из пористого титана. Опил кости укрыт мышечно-фасциальными лоскутами. Кожа ушита наглухо, штифт проведен наружу через центр кожной операционной раны.

Контрольной группе животных выполнена ампутация задней конечности на уровне нижней трети бедра с имплантацией гладкого титанового штифта по описанной выше методике.

Сроки наблюдения в обеих группах составляли 14 и 28 сут.

Морфологические исследования. Проводили электронно-микроскопическое исследование титановых имплантатов (поверхности и поперечного сечения) на электронном сканирующем микроскопе JEOL USA Inc., Peabody, MA (США). Также выполняли морфологическое исследование гистологических срезов окружающих имплантат тканей (окраска гематоксилином—эозином) на световом микроскопе «Люмам-01М» (ЛОМО, Россия) и оптико-электронной системе для исследования мало-контрастных биологических объектов (свидетельство на полезную модель РФ, регистрационный номер 17087 от 10.03.2001). Оптико-электронная система состоит из микроскопа «Люмам-01» с оптическим адаптером, цветной телевизионной ПЗС-камеры, видеомонитора и IBM-совместимого компьютера. Использовали следующие

программы регистрации и корректировки изображения: Vidcap AVI Capture Application, ACDSee v. 3.1, Photo Express.

Результаты и обсуждение

Летальность животных во всех группах экспериментов отсутствовала.

Признаков воспаления культи в обеих группах не наблюдалось. По окончании эксперимента гладкий титановый стержень из костномозгового канала извлекался свободно.

При электронном сканировании исследуемых и контрольных образцов было выявлено, что адгезии клеток к гладкому стержню не происходит (рис. 1); это, возможно, и объясняет низкое качество его фиксации в ране и, следовательно, высокий риск выпадения.

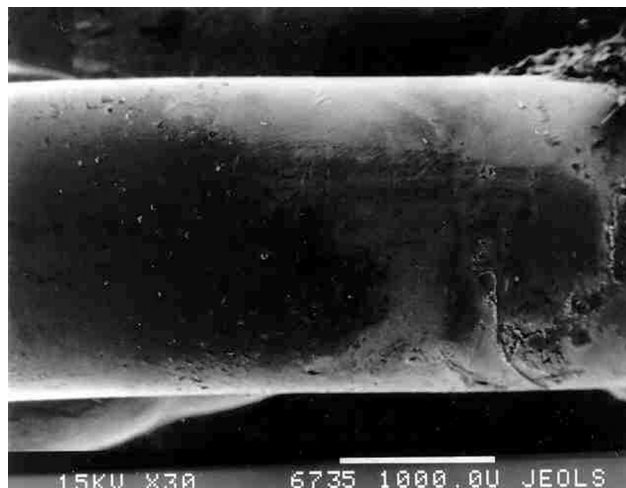


Рис. 1. Гладкий титановый стержень.

4 нед после имплантации. Электронная микроскопическая фотография. 30 ×. Нет признаков клеточной адгезии к гладкой поверхности металла.



Рис. 2. Пористый титановый стержень. Поперечное сечение.

4 нед после имплантации. Электронная микроскопическая фотография. 2000 ×. 1 — эритроциты, 2 — лимфоидные клетки, 3 — фибробластные клетки, 4 — элементы межклеточного матрикса.

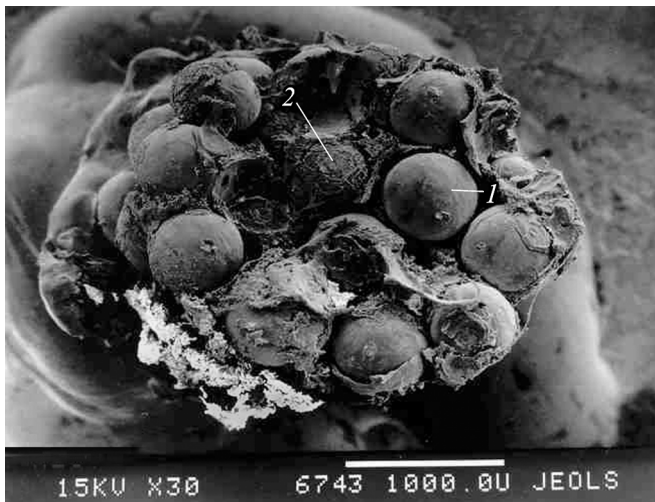


Рис. 3. Пористый титановый стержень. Поперечное сечение области контакта с кожей.

4 нед после имплантации. Электронная микроскопическая фотография. $30\times$. 1 — титановые сферические частицы, 2 — пенетрация клеток и элементов межклеточного матрикса внутрь пор металла.

При извлечении титанового пористого стержня наблюдалось значительное сопротивление в связи с тесным контактом его с окружающими тканями и прорастанием тканей в поры стержня. При электронно-микроскопическом исследовании поперечного сечения титанового стержня на уровне контакта с костью и на уровне контакта с кожей культи было выявлено, что происходит глубокое проникновение клеток (эритроцитов, лимфоидных и фибробластоподобных клеток) и элементов межклеточного матрикса внутрь имплантата, а возможно, и прорастание кровеносных сосудов (рис. 2). При исследовании поверхности имплантата отчетливо видно прорастание тканей в поры между сферическими частицами титанового композита (рис. 3).

Микроскопическое исследование гистологических срезов, окружающих штифты тканей, выявило лимфоидную инфильтрацию как в опытной, так и в контрольной

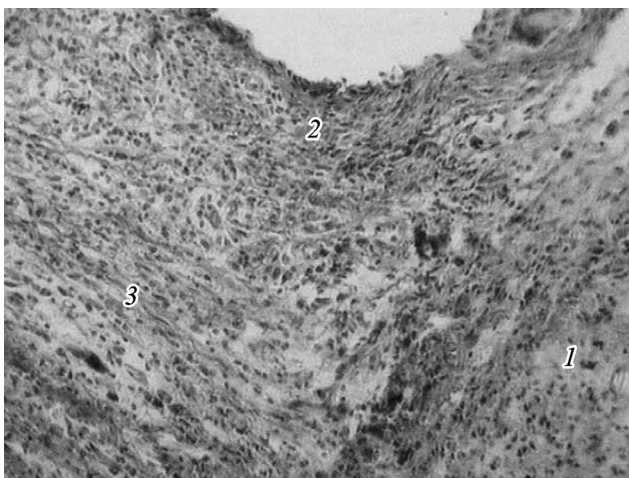


Рис. 4. Ткани, окружающие пористый титановый имплантат. 4 нед после имплантации. Световая микроскопия. Окраска по Ван-Гизону. $600\times$. 1 — лимфоидная инфильтрация; 2 — фиброзная соединительнотканная капсула, окружающая металл; 3 — грануляции.

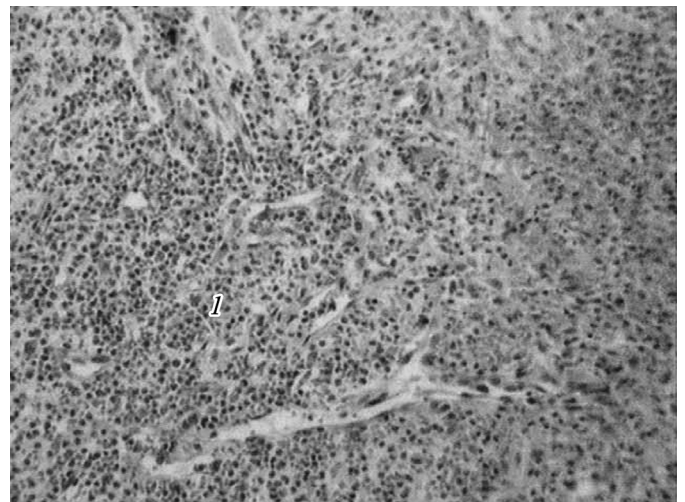


Рис. 5. Ткани, окружающие гладкий титановый имплантат (контрольная группа).

4 нед после имплантации. Световая микроскопия. Окраска гематоксилином—эозином. $600\times$. 1 — нейтрофильная инфильтрация; подозрение на формирование абсцесса.

группах (рис. 4). Лимфоидная инфильтрация объясняется реакцией иммунной системы на чужеродный материал. В двух исследуемых препаратах контрольной группы (с имплантацией гладкого стержня) была выявлена ярко выраженная инфильтрация нейтрофилами (подозрение на формирование абсцесса; рис. 5). В препаратах опытной группы ни в одном случае признаков септического воспаления выявлено не было. Дальнейшая идентификация клеток на поверхности металла и в его порах предполагается при проведении иммуногистохимического анализа.

По результатам двух серий экспериментов можно сделать следующие выводы.

1. Исследуемый материал обладает достаточной биосовместимостью, не вызывает воспалительных реакций окружающих тканей при различных локализациях имплантата (в коже, мышцах, трубчатой и губчатой костях).

2. При имплантации пористого титана происходит «заполнение» пор клетками и элементами межклеточного матрикса, наблюдается «остеоинтеграция», титановый стержень плотно фиксируется к окружающим костной и кожной тканям за счет глубокого проникновения тканевых элементов.

Список литературы

- Blinova M. I., Yudinseva N. V., Kuhareva L. V., Goryuhina O. A., Potokin I. L., Pinaev G. P., Pitkin M. 2004. Skin and bone integrated prosthetic technology. II. Morphology and growth of cells on implants treated with different proteins. In: 9th Russian National Congress «People and Health». St. Petersburg, November 22—26. 205.
- Branemark R., Branemark P. I., Rydevik B., Myers R. R. 2001. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. J. Rehabil. Res. Develop. 38 : 175—181.
- Deligianni D., Katsala N., Koutsoukos P., Missirlis Y. 2001. Effect of surface roughness of hydroxiapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. Biomaterials. 22 : 87—96.
- Galibin O. V., Protasov M. V., Chikhovskaya J. V., Belyaeva I. G., Pitkin M. 2004. Skin and bone integrated prosthetic tech-

nology. III. An exposed implantation of a porous titanium pellet into the skin. In: 9th Russian National Congress «People and Health». St. Petersburg, November 22—26. 210.

Pitkin M., Blinova M. I., Yudintseva N. V., Potokin I. L., Raykhtsaum G., Pinaev G. P. 2004. Skin and bone integrated prosthetic technology. I. Characterization and morphology of human cells cultivated on titanium implants of different structures. In: 9th Russian National Congress «People and Health». St. Petersburg, November 22—26. 217.

Pitkin M., Raykhtsaum G. 2005. Skin Integrated Device. US Patent pending. Sooriakumaran S., Robinson K. P., Ward D. A. 2004. Pattern of Infection of Transfemoral Osseointegration. In: Proc. 11th World Congress, International Society for Prosthetics & Orthotics. Hong Kong. 252.

Sullivan J., Uden M., Robinson K. P., Sooriakumaran S. 2003. Rehabilitation of the trans-femoral amputee with an osseointegrated prosthesis: the United Kingdom experience. *Prosthet. Orthot. Int.* 27 : 114—120.

Поступила 2 VIII 2006

INVESTIGATION OF THE TISSUE GROWTH PROCESSES IN POROUS IMPLANT

O. V. Galibin,^{1,} M. V. Protasov,¹ J. V. Chikhovskaya,¹ I. G. Belyaeva,¹ M. Pitkin²*

¹ I. P. Pavlov St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia,
and ² Tufts University, Boston, USA;

* e-mail: ogalibin@mail.ru

Investigation of the cell (osteocytes, fibroblasts and keratinocytes) adhesion and penetration in pores of the titanium pylon in vivo on the laboratory animals (Wistar rats) has been performed. The titanium pylon has been implanted in bone of a rat's thigh residuum. Electronic scanning and morphological analysis demonstrated the certain integration of the pylon with the surrounding tissues. The latter opens a possibility for development of direct skeletal attachment of limb prostheses.

Key words: porous titanium, osseointegration, cell adhesion.